

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 391—393, Juli 1970

Eine Methode zur Identifizierung und Zuordnung von Laurell-Elektrophorese-Peaks

VON W. STEPHAN UND U. FRAHM

*Aus der Wissenschaftlichen Abteilung der Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt/Main
(Leiter: Privatdozent Dr. H. Determann)*

(Eingegangen am 10. Februar 1970)

Es wird eine Zeit- und Antiserum-sparende Methode zur Identifizierung und Lokalisierung von Laurell-Elektrophorese-Peaks beschrieben und die Lage wichtiger Serumproteine anhand der Laurell-elektrophoretischen Aufnahme eines Normal-Humanserums demonstriert.

A method for the identification and localisation of Laurell electrophoresis peaks

A method, which is economic of time and antiserum, is described for the identification and localisation of Laurell electrophoresis peaks. The position of important serum proteins is demonstrated in the Laurell electrophoresis of normal human serum.

Zur quantitativen immunochemischen Bestimmung von Proteinen bietet sich eine Fülle von Methoden an, z. B. Mikro-Ouchterlony-Technik nach LoGRIPPO (1), radiale Immundiffusion nach MANCINI (2), Elektroimmundiffusion (3) und die Zweiphasen-Elektrophorese nach LAURELL (4). Während es sich bei den beiden erstgenannten Techniken um reine immunologische Diffusionsmethoden handelt, beruhen die 3. und 4. auf der Kombination von Elektrophorese und Antigen-Antikörperreaktion. Die Methoden 1—3 erlauben nur die Bestimmung von jeweils einem Protein, während die Laurell-Elektrophorese die gleichzeitige quantitative Bestimmung von etwa 30 Proteinen ermöglicht.

Die Laurell-Elektrophorese beruht bekanntlich darauf, daß ein Proteingemisch (Serumpool) elektrophoretisch aufgetrennt wird. Der Agarosestreifen, der die aufgetrennten Proteine enthält, wird auf eine zweite Glasplatte gelegt und mit Antikörper-haltiger Agarose angegossen. Bei dem zweiten Elektrophorese-Schritt, der senkrecht zum ersten erfolgt, wandern die Proteine in die Antikörper-haltige Agarose und werden präzipitiert. Die Fläche jedes Protein-Peaks ist der Konzentration dieses Proteins im Proteingemisch direkt proportional. Sie ist außerdem abhängig von der Antikörperkonzentration. Wegen der starken Überlagerung der Protein-Peaks bereitet ihre Identifizierung in einzelnen Fällen erhebliche Schwierigkeiten. Natürlich kann man zur Lokalisierung anstelle von polyvalentem Anti-Humanserum spezifische Antiseren verwenden. Da spezifische Immenserum teuer sind, ist diese Technik sehr unwirtschaftlich.

Es wird im folgenden eine „Streifen“-Methode beschrieben, die mit geringen Mengen spezifischer Antiseren die genaue Lokalisierung von Laurell-Elektrophorese-Peaks ermöglicht.

Identifizierung von Laurell-Elektrophorese-Peaks

Die Identifizierung von Laurell-Elektrophorese-Peaks erfolgt mit Hilfe von Antiserum-haltigen Filterpapierstreifen. Dazu werden schmale Filterpapierstreifen mit 0,1—0,2 ml spezifischem Antiserum getränkt und auf die Agaroseplatte gelegt. Drei Streifen mit verschiedenen spezifischen Antiseren können so auf einer Agaroseplatte in bestimmten Abständen nebeneinander angeordnet werden. Über Nacht läßt man das Antiserum in die Agarose diffundieren. Während der zweiten Phase der Laurell-Elektrophorese wandern die Proteine in die Antikörperzonen und werden präzipitiert. Bei der Anordnung der Antiserum-haltigen Filterpapierstreifen ist darauf zu achten, daß das Antiserum gegen das Protein mit der größten Wanderungsgeschwindigkeit am weitesten von der Auftragstelle entfernt ist, sich also im obersten Streifen befindet.

Danach mißt man die einzelnen Wanderungsstrecken. Der Vergleich mit einer parallel dazu gelaufenen Total-Laurell-Elektrophorese erlaubt eine schnelle Lokalisierung der entsprechenden Laurell-Elektrophorese-Peaks, wobei deren charakteristische Gestalt, die auch bei der Streifentechnik weitgehend erhalten bleibt, eine zusätzliche Orientierungshilfe ist.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen typische Aufnahmen von Proteinen, die mit der „Streifen-Methode“ dargestellt wurden.

Auf diese Art wurden in der Laurell-elektrophoretischen Auftrennung eines Normal-Serums (Abb. 3) 13 Peaks identifiziert (Tab. 1).

Beschreibung der Versuche

Reagenzien und Apparate

Es wurde mit 0,075M Barbituratpuffer pH 8,6 folgender Zusammensetzung gearbeitet:

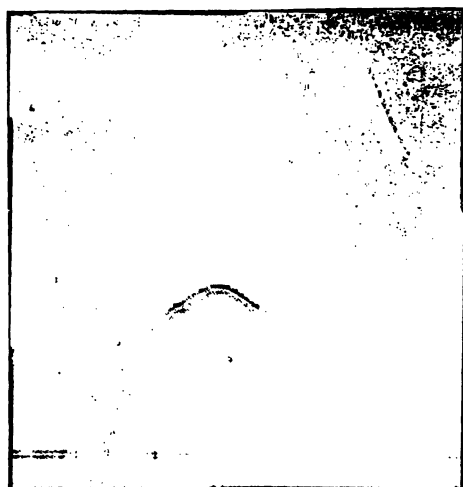


Abb. 1



Abb. 2

Abb. 1 und 2

Darstellung von Laurell-Elektrophorese-Peaks unter Verwendung von Antiserum-haltigen Filterpapierstreifen

von oben nach unten
saurer α_1 -Glycoprotein
 α_2 -Makroglobulin
 β_1 A-Globulin

α_1 -Antitrypsin
Haptoglobin
Transferrin

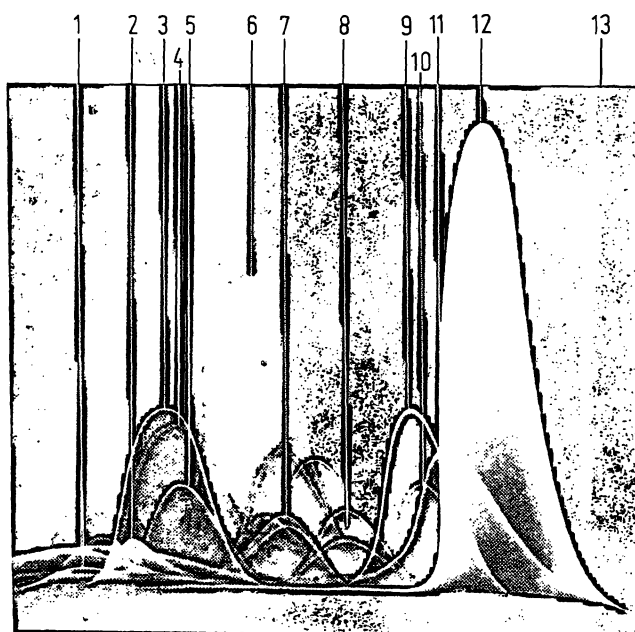


Abb. 3

Laurell-elektrophoretische Auftrennung eines Normal-Humanserums

- | | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| 1 β_2 C-Globulin | 8 Coeruloplasmin |
| 2 β -Lipoprotein | 9 α_1 -Antitrypsin |
| 3 Transferrin | 10 saurer α_1 -Glycoprotein |
| 4 Haemopexin | 11 α_1 -Lipoprotein |
| 5 β_1 A-Globulin | 12 Albumin |
| 6 Haptoglobin | 13 Präalbumin |
| 7 α_2 -Makroglobulin | |

Natrium-Barbiturat: 154,0 g Calciumlactat: 7,7 g
Barbitursäure: 27,6 g Natriumazid: 2,0 g

ad 10 l mit dest. Wasser auffüllen.

Für die Elektrophorese wird der Puffer 0,0375M verwendet.

Als Antiseren dienen die Präparate der Behringwerke/Marburg.

Filterpapier (2043b Mgl.) wurde von Schleicher u. Schüll/München bezogen.

Die elektrophoretische Auftrennung wurde in der Kammer der Fa. Paines & Byrne, Greenford, England auf Glasplatten der Größe 10 x 10 cm durchgeführt.

Zum Auftragen der Serumproben wurde eine Terumo-Mikrosyringe (UMS 10) der Fa. Shandon und zum Stanzen der Auf-

tragsbrunnen ein Well-Cutter (6818 A, Ø: 1,5 mm) der Fa. LKB verwendet.

Aufgetrennt wurden je 3 µl 5proz. Normal-Humanserum aus einem 100-Spender-Pool.

Arbeitsgang

Bereitung der Platten für die 1. Elektrophorese-Phase

Drei 25-ml-Erlenmeyerkölbchen mit jeweils 11,5 ml Puffer werden in einem Wasserbad auf 50° erwärmt. Die in einem siedenden Wasserbad gelöste 2proz. Agarose wird auf 50° abgekühlt. Haben beide Lösungen dieselbe Temperatur, so fügt man jeweils 11,5 ml Agaroselösung in die Pufferkölbchen und durchmischt. Den Inhalt eines Kölbchens gießt man auf eine Glasplatte. Nach dem Erstarren werden die Platten in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Bereitung der Antikörper-haltigen Agarose

a) 7,5 ml Puffer werden in einem 25-ml-Erlenmeyerkölbchen auf 50° im Wasserbad erwärmt. In einem siedenden Wasserbad verflüssigt man 25 ml 2proz. Agarosegel, das anschließend auf 50° temperiert wird. Kurz bevor 7,5 ml dieser Agaroselösung dem Puffer zugesetzt werden, gibt man 2 ml Antihumanserum vom Kaninchen in den Pufferkolben. Man durchmischt durch vorsichtiges Umschwenken.

b) Auf eine Platte (Herstellung wie oben beschrieben) legt man drei Filterpapierstreifen (Ø: 0,4 cm), die vorher mit jeweils 0,1 ml spezifischem Antiserum getränkt worden sind, im Abstand von 1,0 cm nebeneinander. Die Platte wird in einer feuchten Kammer gelagert. Während 20 Stdn. diffundiert das spezifische Antiserum in die Agarose. Die Papierstreifen werden anschließend wieder entfernt. Auf einer so präparierten Agaroseplatte lassen sich gleichzeitig drei Serumproteine darstellen. Die Zahl der auf diese Weise prinzipiell zu identifizierenden Serumproteine ist abhängig von der Anzahl der erhältlichen spezifischen Antiseren.

Erste Phase der Elektrophorese

Auf einer wie oben gegossenen Platte werden mit einem Lochmesser von Hand drei Löcher vorgestanzt und mit einer Wasserstrahlpumpe ausgehoben. Pro Loch werden 3 µl des Serumpools aufgetragen. Die Platten werden in die Elektrophoresekammer gelegt und die Verbindung zum Puffer mit quadratischen Filterpapieren (9 x 9 cm) hergestellt. Das Proteingemisch wird bei 200 Volt = 34 mA und 25° für 3 Stdn. 5 cm weit aufgetrennt. Die Agaroseschicht wird anschließend mittels eines Küchenmessers in Streifen geschnitten, die vorsichtig auf eine zweite Glasplatte gebracht werden.

Zweite Phase der Elektrophorese

a) Einer der in der ersten Phase der Elektrophorese erhaltenen Agarosestreifen wird mit der bereitstehenden Antikörper-haltigen Agarose angegossen. Die Platte dient der Darstellung des gesamten Serumproteinspektrums.

b) Weitere Agarosestreifen werden für die mit spezifischen Antisera präparierten Platten benötigt. Man schneidet ein 2 cm breites Stück dieser Agaroseplatten ab und ersetzt es durch einen 1,5 cm breiten Agarosestreifen der 1. Elektrophorese-Phase. Der entstehende Spalt von 0,5 cm wird mit Puffer-Agarose-Gemisch (1 + 1) ausgegossen.

Die in der zweiten Phase der Elektrophorese nach a) und b) hergestellten Platten werden in die Elektrophoresekammer gelegt und

die Verbindung zum Puffer wieder mit Filterpapier (9 × 9 cm) hergestellt. Der zweite Elektrophorese-Schritt dauert 22 Stdn. bei 100 Volt, 20 mA und 25°.

Aufarbeitung und Färbung

Nach abgeschlossener Elektrophorese werden die Platten für 24—48 Stdn. in 0,9proz. NaCl- + 0,1proz. Na-azid-Lösung proteinfrei gewaschen. Anschließend werden sie durch Abdecken mit feuchtem Filterpapier (10 × 10 cm) unter einer Glühbirne getrocknet. Für 5 Min. fixiert man sie in 2proz. Essigsäure, färbt 10 Min. in 0,5proz. Amidoschwarz 10 B und entfärbt in Methanol-Eisessig (9 + 1, v + v).

Literatur

1. LOGRIPPO, G. A. und N. S. SHARPLESS, *Henry Ford Hosp. Med. Bull.* 13, 55 (1965). — 2. GOLDBERGER, S., V. LOPEZ und H. KELLER, *diese Z.* 7, 448 (1969) 7, 448 (1969). — 3. MERRILL, D.,

TH. HARTLEY und H. N. CLAMAN: *J. Laborat. Clin. Med. S. Louis* 69, 151 (1967). — 4. CLARKE, M. und T. FREEMAN, *Protides of the Biological Fluids*, Hrsg. H. PETERS 14, 503 (1966).

Dr. W. Stephan
Biotest-Serum-Institut GmbH
6000 Frankfurt/Main
Flughafenstr. 4